

Πείραμα ELISA

Μάθημα: Εμβιομηχανική & Βιοϊατρική Τεχνολογία

Ζαχαριάς Γεώργιος
Λέγγα Παναγιώτα
Παντελίδης Ισίδωρος
Τριανταφύλλου Πασχαλίνα

Υπεύθυνος Μαθήματος: Αλεξόπουλος Λεωνίδας

Βοηθός Διδασκαλίας: Τζεράνης Δημήτριος

Μέντορες: Μεσσήνης Δημήτριος, Περδικάρη Μυρτώ

Τετάρτη, Ιανουάριος 13, 2016

Περίληψη

Ο σκοπός του βιολογικού πειράματος Elisa είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Albumin σε δείγματα ούρων που δόθηκαν από δύο υγιείς δότες και έναν ασθενή. Χρησιμοποιηθήκαν δύο διαφορετικοί αναλυτές, Analyte 26 και Analyte 37, όπου για κάθε έναν από αυτούς βρέθηκε το MFI των τριών δοτών και των wells για την κατασκευή της καμπύλης standard. Έχοντας δημιουργήσει το διάγραμμα ($MFI - C$), και γνωρίζοντας τα MFI των δοτών, ήμασταν τελικά σε θέση να βρούμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα ούρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΑ

- 1. Εισαγωγικά**
- 2. Ορισμοί**
- 3. Εξοπλισμός**
- 4. Multiplex ELISA**
- 5. Πειραματική Διαδικασία**
- 6. Αποτελέσματα**
- 7. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων**

1.Εισαγωγικά

Τι είναι η μέθοδος ELISA:

Η γνωστή μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay) είναι μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η ELISA μπορεί να εφαρμοσθεί για την αξιολόγηση είτε της παρουσίας ενός αντιγόνου είτε της παρουσίας ενός αντισώματος σε ένα δείγμα, συνεπώς αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αντισωμάτων σε ορό. Επίσης η μέθοδος έχει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων για τον εντοπισμό δυνητικά αλλεργιογόνων τροφών. Η ELISA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην τοξικολογία ως μια προκαταρκτική διάγνωση για ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων (και ναρκωτικών). Τέλος, με αυτή τη μέθοδο πραγματοποιείται και το τεστ δυσανεξίας των τροφών, αλλά η εγκυρότητα του εν λόγω τεστ είναι αμφιλεγόμενη.

Οι διάφορες τεχνικές ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτική όσο και για ποιοτική ανάλυση. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (OD) δείγματος και τη σύγκριση αυτής με μια πρότυπη καμπύλη, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλά ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα.

Περιγραφή Μεθόδου: Τα αντιγόνα του δείγματος προσκολλώνται σε μία στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια εφαρμόζεται ειδικό αντίσωμα προκειμένου να προσδεθεί το αντιγόνο. Στο αντίσωμα αυτό έχει προσδεθεί ένα ένζυμο του οποίου το υπόστρωμα προστίθεται στο τέλος της διαδικασίας. Τέλος, μέσω της αλλαγής του χρώματος που παρουσιάζεται στο υπόστρωμα, γίνεται συλλογή των πληροφοριών που χρειαζόμαστε για το δείγμα φυσικά με τη χρήση μηχανήματος.

Τύποι της Μεθόδου ELISA:

- **Άμεση ELISA(Direct ELISA)**

Είναι ο πιο απλός τύπος της μεθόδου ELISA. Το αντιγόνο προσκολλάται στη στερεή φάση και στη συνέχεια προστίθεται ένα αντίσωμα το οποίο είναι σημασμένο με κατάλληλο ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιγόνου. Το πρωτογενές αντίσωμα σε αυτή τη διαδικασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο.

Πλεονέκτημα: Διαρκεί λίγο χρόνο και δεν απαιτεί τη χρήση δευτερογενούς αντισώματος.

Μειονέκτημα: Κάθε αντίσωμα πρέπει να σηματοδοτείται με διαφορετικό τίτλο, πράγμα το οποίο μπορεί να αποτελέσει μια πολύ χρονοβόρα διαδικασία σε ένα πείραμα.

- **Έμμεση ELISA(Indirect ELISA)**

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την άμεση ELISA αλλά δε χρειάζεται η ονομασία των πρωτογενών αντισωμάτων καθώς αυτά ανιχνεύονται από δευτερογενή αντισώματα τα οποία προστίθενται στη διαδικασία.

Πλεονέκτημα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία καθώς παραπάνω από ένα σημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται από κάθε μόριο αντιγόνου. Είναι πιο ευέλικτη μέθοδος σε σχέση με την άμεση καθώς διαφορετικά πρωτογενή αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από ένα επισημασμένο αντίσωμα. Τέλος, είναι πιο φτήνη μέθοδος αφού δεν χρειάζεται επισήμανση κάθε αντισώματος.

Μειονέκτημα: Ορισμένες φορές μπορεί να δίνει μη ειδικά αποτελέσματα λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης που μπορεί να επιφέρει το δευτερεύον αντίσωμα.

- **Ανταγωνιστική ELISA(Competitive ELISA)**

Το αντιγόνο ενδιαφέροντος από το μίγμα και το προστιθέμενο αντιγόνο «ανταγωνίζονται» για τη δέσμευσή τους από το αντίσωμα. Η μείωση στο σήμα ανίχνευσης σε σύγκριση με τα καθαρισμένα αντιγόνα στα δοκιμαστικά βοηθία δείχνουν την ύπαρξη αντιγόνων στο μίγμα.

Πλεονέκτημα: Παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια αφού χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για τη δέσμευση της ουσίας που μελετάμε.

Μειονέκτημα: Μειωμένη ακρίβεια στα δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις αφού όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του μίγματος τόσο χαμηλότερο είναι το σήμα ανίχνευσης.

- **Sandwich ELISA**

Το αντιγόνο που θέλουμε να μετρήσουμε δεσμεύεται μεταξύ ενός στρώματος αντισωμάτων σύλληψης και ενός στρώματος αντισωμάτων ανίχνευσης. Τα δύο αντισώματα πρέπει να διαλεχθούν με προσοχή για να έχουμε διασταυρούμενη αντίδραση.

Πλεονέκτημα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Χρησιμοποιείται για περίπλοκα δείγματα γιατί δε χρειάζεται καθαρισμός πριν από τη μέτρηση.

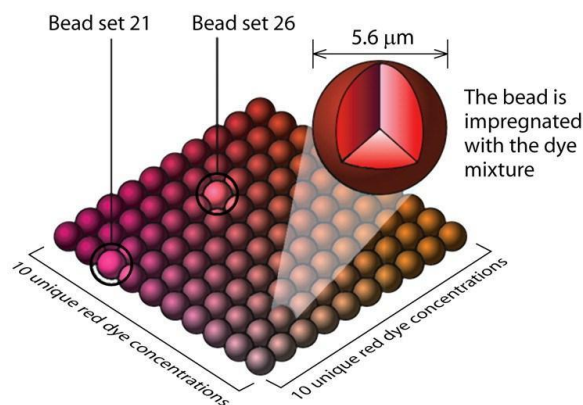
Μειονέκτημα: Τα αντιγόνα θα πρέπει να έχουν τουλάχιστον δύο θέσεις για τη δέσμευση των αντισωμάτων.

❖ **Bead-Based Multiplex Sandwich ELISA**

Αποτελεί παραλλαγή της Sandwich ELISA. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια για την πρόσδεση των αντισωμάτων. Αυτά τα μικροσφαιρίδια είναι μαγνητικά και με τον εμπλουτισμό τους με φθορίζουσες ουσίες παράγουν ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων που βοηθούν στην δέσμευση του αντισώματος. Ο όρος Multiplex μας δίνει τη δυνατότητα να μετρήσουμε διάφορους αναλύτες(π.χ. πρωτεΐνες) σε ένα μόνο τρέξιμο. Δηλαδή, αν σε κάθε δείγμα προσθέσουμε διάφορα beads, τότε κάθε bead μπορεί να ανιχνεύσει μία διαφορετική πρωτεΐνη. Η διαδικασία αυτή θα πραγματοποιηθεί μέσω μηχανήματος που μας προσφέρει η εταιρεία Luminex.

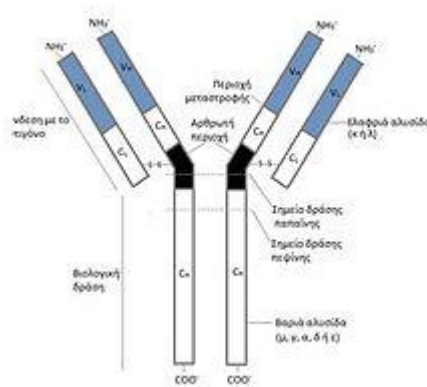
2.ΟΡΙΣΜΟΙ

Magnetic Micro - Beads: Είναι μαγνητικά μικροσφαιρίδια τα οποία εμπλουτίζονται με φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες παράγουν ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων για την πρόσδεση – δέσμευση του αντιγόνου. Τα μικροσφαιρίδια αυτά δεν είναι ορατά με το μάτι και γι' αυτό έχουν μαγνητικές ιδιότητες προκειμένου να μπορούμε να τα χειριστούμε.



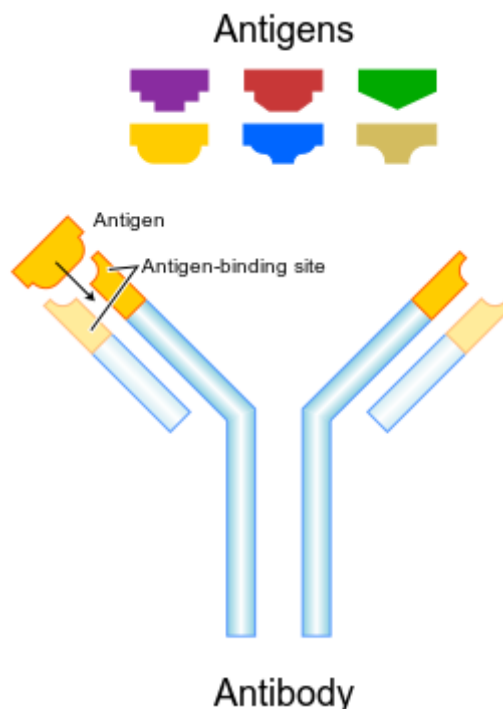
Εικόνα 1: Magnetic Micro-beads

Αντισώματα: Ένα αντίσωμα γνωστό και ως ανοσοσφαιρίνη είναι ένα μεγάλο σχήματος Y πρωτεϊνικό μόριο που παράγεται από τα B - λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει ξένα αντικείμενα όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό κομμάτι του εισβολέα που ονομάζεται αντιγόνο. Κάθε άκρη του «Y» μιας ανοσοσφαιρίνης περιέχει ένα παράτοπο (δομή που ομοιάζει με κλειδαριά) που αναγνωρίζει ειδικά ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο (που παρομοιάζεται με κλειδί), και συνδέονται με ακρίβεια. Με την σύνδεση ένα αντίσωμα μπορεί να καταδείξει ένα μικρόβιο ή ένα μολυσμένο κύτταρο για επίθεση από άλλα κομμάτια του ανοσοποιητικού συστήματος, ή να εξουδετερώσει το στόχο του απευθείας.



Εικόνα 2: Αντισώματα

Αντιγόνα: Ένας πρωτεϊνικός ή ολιγοσακχαριδικός δείκτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων με βάση τον οποίο αναγνωρίζεται το κύτταρο σαν ενδογενές ή εξωγενές, αναγνωρίζεται η προέλευση του κυττάρου π.χ. δέρμα, νεφροί, ενεργοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων, από τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία απενεργοποιούν ή καταστρέφουν το κύτταρο εάν είναι αναγκαίο· και ενεργοποιούν την κυτταροτοξική αντίδραση των κοκκιοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων. Τα αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του οργανισμού ονομάζονται αυτοαντιγόνα. Τα αντιγόνα που βρίσκονται σε όλα τα άλλα κύτταρα ονομάζονται ξένα αντιγόνα. Η ταύτιση αρκετών τύπων ιστικών αντιγόνων είναι σημαντική για την επιτυχή μεταμόσχευση κάποιου οργάνου. Φλεγμονή προκαλείται όταν τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εντοπίσουν κάποιο αντιγόνο οποιασδήποτε προέλευσης σε περίπτωση κάποιου τραυματισμού του σώματος. Το αντιγόνο μπορεί να είναι ξένο ή αυτοαντιγόνο, το οποίο έχει υποστεί κάποια εκφύλιση και για το λόγο αυτό αναγνωρίζεται σαν ξένο. Η αντίδραση των Β και Τ λεμφοκυττάρων σε κάποιο αντιγόνο αποτελεί τμήμα της ειδικής ανοσολογικής απάντησης.



Εικόνα 3:Αντιγόνα

Αλμπουμίνη: Η λεκωματίνη, η οποία ονομάζεται και αλβουμίνη (επίσης αλμπουμίνη, από το λατ. albus, «λευκός»), αναφέρεται γενικότερα σε οποιαδήποτε υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία έχει μέτρια διαλυτότητα σε συμπυκνωμένα αλατούχα διαλύματα και υφίσταται θερμική πήξη. Οι λεκωματίνες βρίσκονται σε πλάσμα αίματος και διαφέρουν από τις άλλες πρωτεΐνες του αίματος, καθώς επίσης ρυθμίζουν την πίεση του αίματος. Ουσίες που περιέχουν λεκωματίνη, όπως το ασπράδι του αυγού, ονομάζονται λεκωματοειδή (αλβουμινοειδή).

Assay Buffer: Είναι διαλύτης ο οποίος χρησιμοποιείται σε μεθόδους ανίχνευσης όπως η ELISA και ρυθμίζει τη δέσμευση των πρωτεϊνών αποκλείοντας τις περισσευούμενες θέσεις δέσμευσης.

SAPE: Η στρεπταβιδίνη είναι μια βακτηριακά προερχόμενη πρωτεΐνη δέσμευσης βιοτίνης. Γνωστή και ως R-φυκοερυθρίνη (RPE) ανήκει σε μία κατηγορία πρωτεϊνών τις φυκοβιλοπρωτεΐνες οι οποίες έχουν ένα εξαιρετικά φθορίζον χρώμα με μέγιστη εκπομπή ~ 578nm.

3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Multiwell Plate: Αποτελεί μία επίπεδη πλαστική πλάκα η οποία αποτελείται από 96 «βοθρία-πηγάδια» (wells). Είναι ένα πρότυπο εργαλείο για αναλυτικές έρευνες καθώς και για εργαστήρια που πραγματοποιούν διαγνωστικές εξετάσεις. Κάθε βοθρίο μπορεί να φιλοξενήσει δεκάδες νανόλιτρα υγρού και μπορεί να έχει τετράγωνο ή κυκλικό σχήμα. Επίσης, σηματοδοτούνται με αριθμούς σε κάθε στήλη και με γράμματα σε κάθε σειρά προκρίμένου να γίνεται ταυτοποίηση για συγκεκριμένο δείγμα.



Εικόνα 4: Multiwell Plate

Πιπέτα: Είναι το εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ακριβή δειγματοληψία και διανομή υγρών όγκων.



Εικόνα 5: Πιπέτα

Eppendorf Tubes: Είναι σωλήνες διαφορών χωρητικότητων οι οποίοι διαθέτουν πώμα και χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία μειγμάτων.



Εικόνα 6: Tubes

Vortex Mixer: Είναι μία συσκευή η οποία χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για την ανάμιξη διαλυμάτων. Αποτελείται από ένα ηλεκτρικό μοτέρ με τον κινητήριο άξονα προσανατολισμένο κάθετα και συνδέεται με ένα «κύπελλο» από καουτσούκ. Καθώς ο κινητήρας λειτουργεί, το τεμάχιο καουτσούκ ταλαντώνεται ταχέως σε μια κυκλική κίνηση. Όταν ένας δοκιμαστικός σωλήνας ή άλλο κατάλληλο δοχείο πιέζεται μέσα στο «κύπελλο» από καουτσούκ, η κίνηση μεταδίδεται στο υγρό μέσα, και μια δίνη δημιουργείται. Τα περισσότερα μίξερ έχουν διάφορες ρυθμίσεις ταχύτητας και μπορεί να προγραμματιστούν έτσι ώστε να λειτουργούν συνεχώς, ή να λειτουργούν μόνο όταν εφαρμόζεται καθοδική πίεση στο «κύπελλο» από καουτσούκ.



Εικόνα 7: Vortex Mixer

Αναδευτήρας: Αποτελείται από μία μεταλλική οριζόντια τράπεζα η οποία ταλαντώνεται τροφοδοτούμενη από ηλεκτρικό κινητήρα. Πάνω σε αυτή τοποθετούνται τα προς ανάδευση διαλύματα.



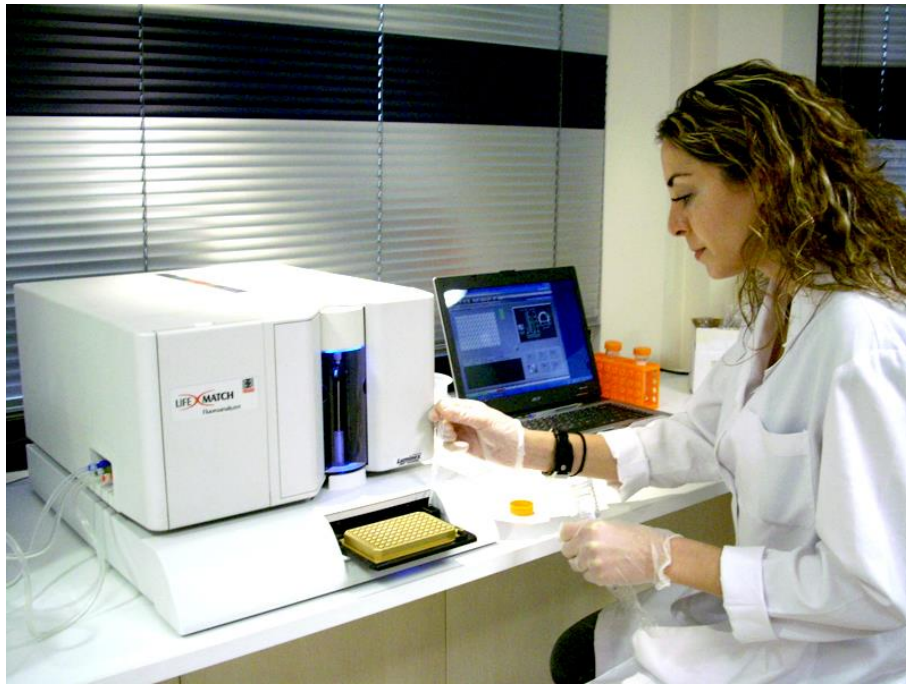
Εικόνα 8:Αναδευτήρας

Μαγνητικός διαχωριστής: Σε αυτή τοποθετείται η multiwell plate κατά την διαδικασία των ξεπλυμάτων έτσι ώστε να συγκρατούνται τα beads. Διαθέτει λαβές συγκράτησης.



Εικόνα 9:Μαγνητική Πλάκα

Luminex: Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό του αντιγόνου ή του αντισώματος μέσω της μέτρησης του φθορίζοντος χρώματος το οποίο εκπέμπεται από τα wells. Επίσης είναι η τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παραπάνω από μιας ουσίας σε ένα ενιαίο τρέξιμο.

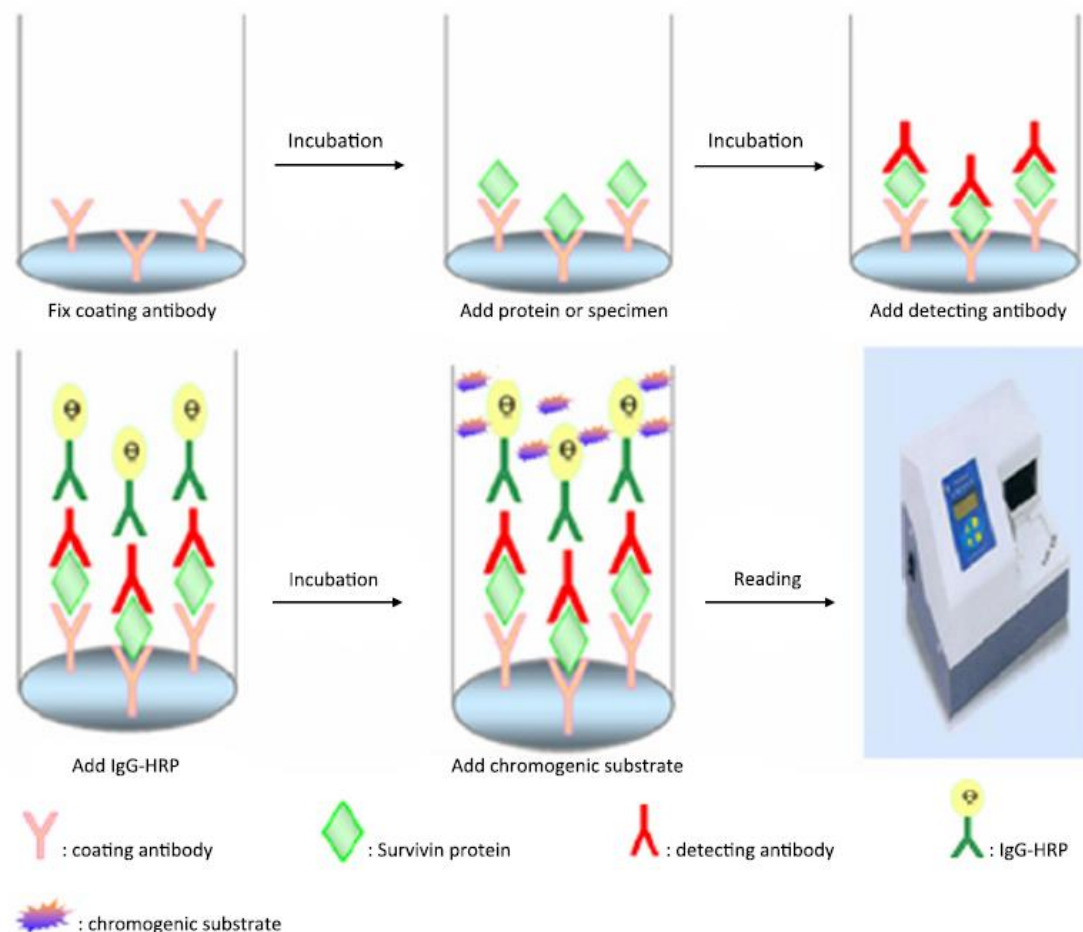


Εικόνα 10:Luminex

4. Multiplex ELISA

Τα βήματα της μεθόδου Multiplex ELISA

Σε ένα διάλυμα που περιέχει σε υψηλή συγκέντρωση την ουσία που θέλουμε να εξετάσουμε προστίθενται τα magnetic micro-beads, τα οποία είναι βαμμένα με φθορίζουσες ουσίες, επικαλυμμένα με ειδικά αντισώματα τα οποία εντοπίζονται από την ουσία που θέλουμε να εξετάσουμε (π.χ. πρωτεΐνη). Στη συνέχεια προστίθενται αντισώματα για την ανίχνευση του αναλύτη που αναζητάμε δημιουργώντας ένα σαντουιτς αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια με τη χρήση μηχανήματος γίνεται η ανίχνευση της πρωτεΐνης που μελατάμε στο διάλυμα.



Εικόνα 11: Μέθοδος Bead-Based Multiplex Sandwich Elisa

5.Πειραματική διαδικασία

Ατο πείραμα που διεξήχθηκε στο εργαστήριο μετρήθηκε η ύπαρξη της πρωτεΐνης αλβουμίνης σε δείγμα ούρων. Στη συνέχεια θα περιγράψουμε τα βήματα που ακολουθήσαμε κατά την διαδικασία του πειράματος.

1. Τοποθετούμε assay buffer σε ένα δοχείο και ετοιμάζουμε την multiwell plate.
2. Ετοιμάζουμε το μίγμα με τα beads.
3. Προσθέτουμε τα beads στην multiwell plate.
4. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.
5. Χρησιμοποιούμε μία πιπέτα για την αναρρόφηση 100mL assay buffer.
6. Το προσθέτουμε στην multiwell plate.
7. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.
8. Τοποθετούμε 50μL από το δείγμα στην πλάκα.
9. Καλύπτουμε και αναδεύουμε για 90 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα(800rpm)..
10. Λίγο πριν την λήξη της επώασης, ετοιμάζουμε το μίγμα για τα αντισώματα αντίχνευσης. Για κάθε well θέλουμε 20μL.
11. Χρησιμοποιούμε μία πιπέτα για την αναρρόφηση 100mL assay buffer.
12. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.
13. Χρησιμοποιούμε μία πιπέτα για την αναρρόφηση 100mL assay buffer.
14. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.
15. Προσθέτουμε το μίγμα με τα αντισώματα (20μL για κάθε well).
16. Καλύπτουμε και αναδεύουμε για 60 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (800rpm).
17. Παράλληλα με τη διαδικασία 16 ανοίγουμε το Luminex.
18. Τοποθετούμε τη multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή, προσθέτουμε 100μL assay buffer σε κάθε well και χύνουμε το υπερκείμενο.
19. Προσθέτουμε 100μL assay buffer σε κάθε well.
20. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.
21. Προετοιμάζουμε το μίγμα SAPE διαλύοντας 1:200 το stockSAPE μέσα σε assay buffer. Φτιάχνουμε τόσο ώστε να να τοποθετήσουμε 50μL σε κάθε well.
22. Προσθέτουμε το φωτοφοβικό μίγμα SAPE(50μL/well).
23. Καλύπτουμε και αναδεύουμε τη multiwell plate για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (800rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Τοποθετούμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και περιμένουμε για ένα λεπτό και στη συνέχεια χύνουμε το υπερκείμενο.

25. Βγάζουμε την multiwell plate στο μαγνητικό διαχωριστή και τοποθετούμε 130μL από assay buffer σε κάθε well.
26. Καλύπτουμε την πλάκα και αναδεύουμε για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (900rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
27. Μετά την ανάδευση τοποθετούμε την πλάκα στο Luminex για μέτρηση.
28. Αναλύουμε 100μL στο Luminex σύμφωνα με τις οδηγίες.

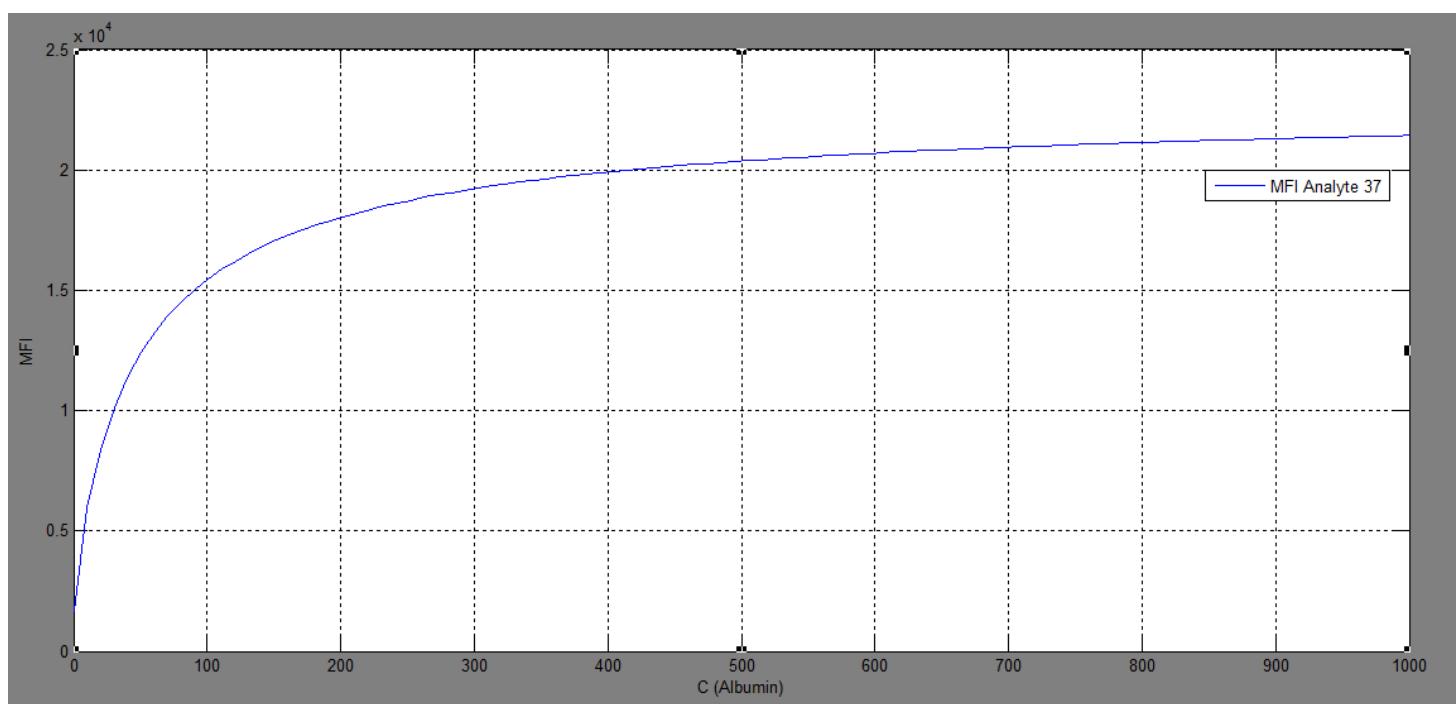
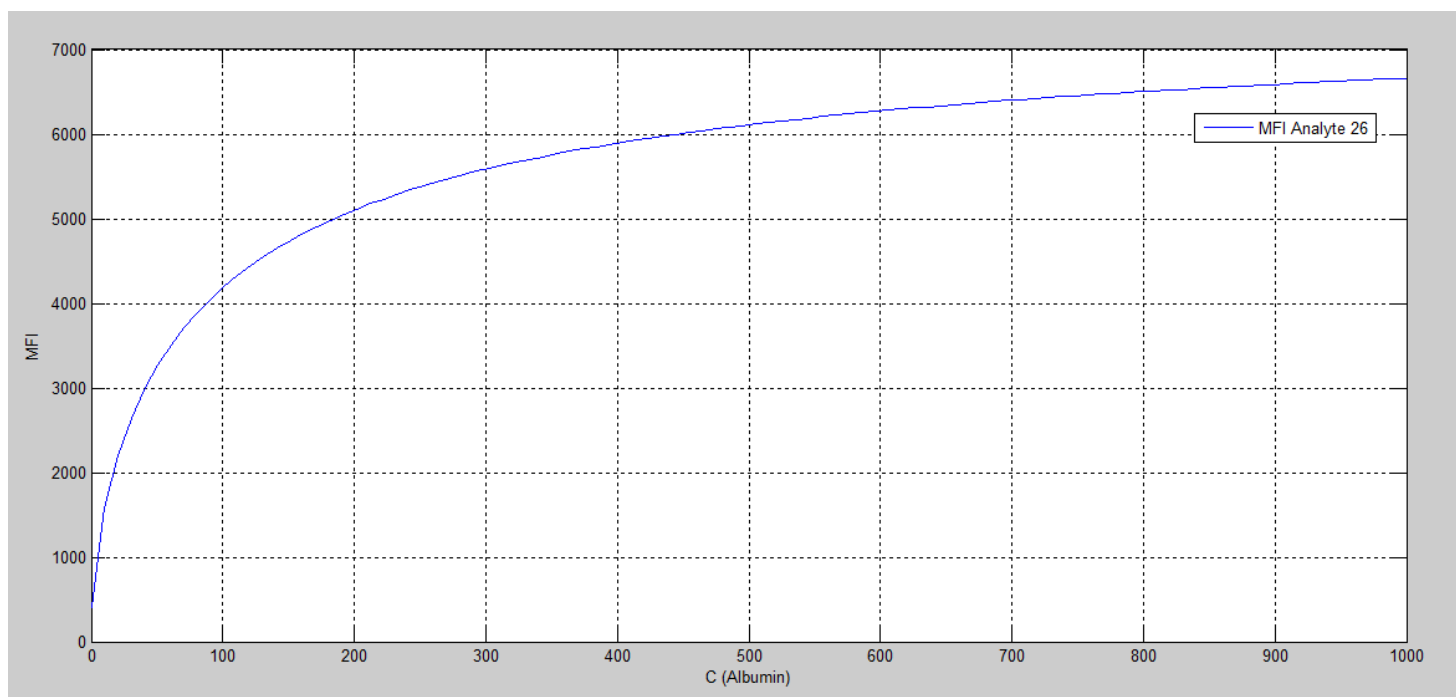
6. Αποτελέσματα

Για την προετοιμασία του multiwell plate, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, με στόχο να πάρουμε τα απαραίτητα για εμάς αποτελέσματα:

1. Για κάθε ένα από τους τρεις δότες, χρησιμοποιήθηκαν τρία wells, εισάγοντας σε αυτά την ίδια ποσότητα δείγματος.
2. Σε έξι ξεχωριστά wells, τοποθετήσαμε διάλυμα γνωστών συγκεντρώσεων αλμπουμίνης με σκοπό να κατασκευάσουμε την καμπύλη standard.
3. Στα συνολικά χρησιμοποιούμενα 15 wells, είχαν τοποθετηθεί δύο διαφορετικοί αναλυτές - beads (Analyte 26, Analyte 37).
4. Στη συνέχεια, με τη χρήση του Luminex πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

	<u>Median Fluorescence Intensity (MFI)</u>	
	<u>Analyte 26</u>	<u>Analyte 37</u>
<u>Patient 1</u>	165	794
	2402.5	2190.5
	1953	2175
<u>Patient 2</u>	1985	3299
	1011.5	4399
	1452	3126
<u>Patient 3</u>	6607	16793
	7975	17990.5
	5743.5	16546
<u>Calibration Values</u>	6492	21517
	5554.5	17864
	2418	11452
	1616	5424
	1195	2375
	38.5	1885

5. Με βάση τη μέθοδο 4 Parameter Logistic Curving Fitting (4PL) σχεδιάσαμε στο περιβάλλον Matlab την αντίστοιχη καμπύλη για κάθε αναλυτή.

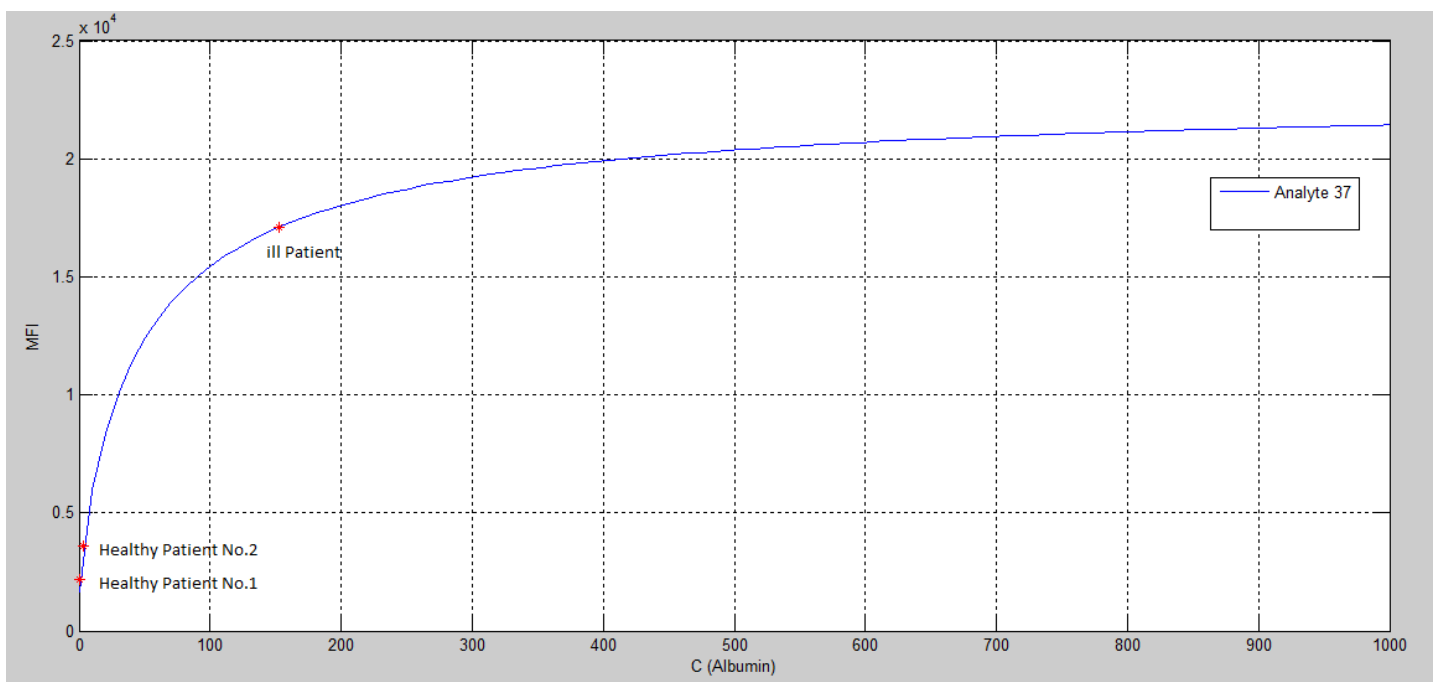
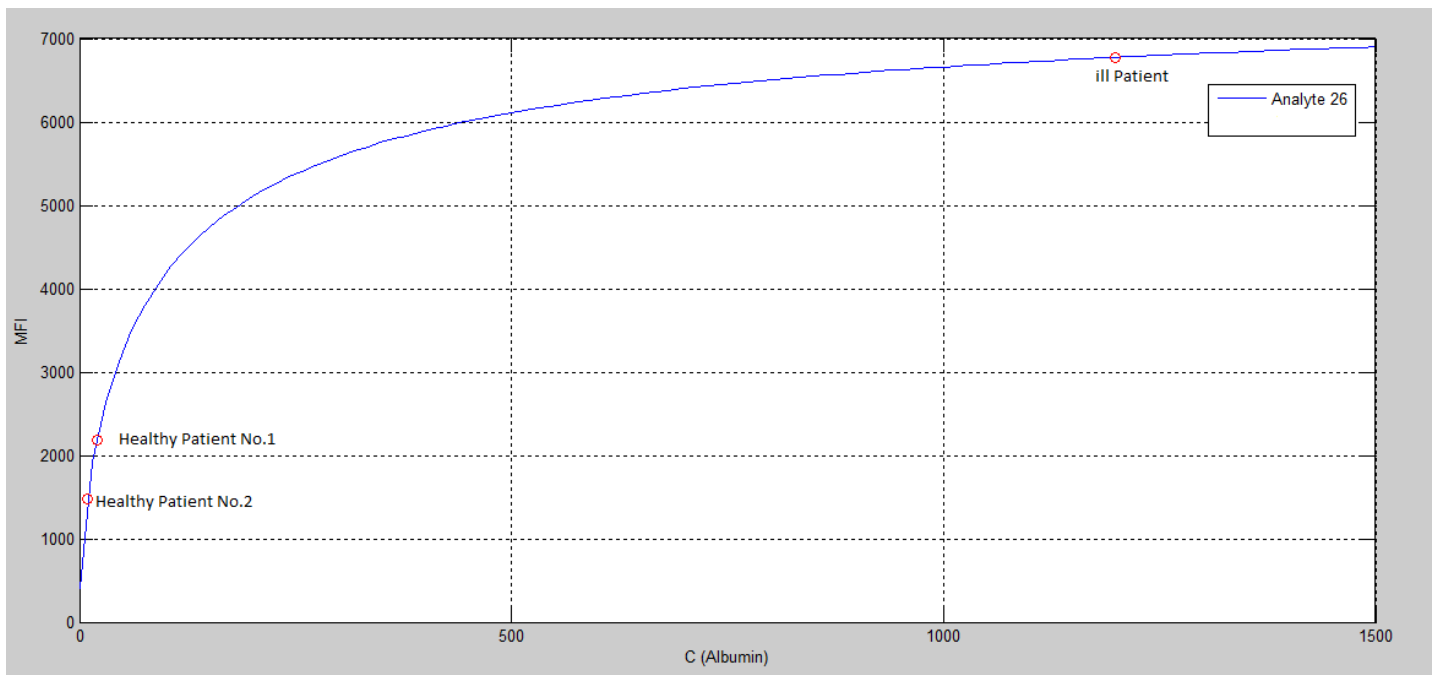


6. Για κάθε έναν από τους τρεις δότες, πήραμε τη μέση τιμή των τριών δειγμάτων. Οι ακραίες τιμές δε λήφθηκαν υπόψιν στον υπολογισμό με βάση τις οδηγίες του εργαστηριακού επιβλέποντα.
7. Τέλος, με τη χρήση της Matlab, αντιστοιχίσαμε τα MFI του κάθε ασθενή στην αντίστοιχη καμπύλη, με αποτέλεσμα να προκύψουν οι συγκεντρώσεις. Ο κάθε ασθενής έχει δύο συγκεντρώσεις, μία για κάθε αναλυτή. Η πραγματική συγκέντρωση λόγω της αραίωσης που είχε γίνει αρχικά $C_{real} = C_{diagram} * 1000$.

Analyte 26			
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
MFI (AVG)	2178	1483	6775
$C_{diagram}(\text{ng/ml})$	19.88	8.72	1199.2
$C_{real}(\text{mg/ml})$	19.88	8.72	1199.2

Analyte 37			
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
MFI (AVG)	2183	3608	17110
$C_{diagram}(\text{ng/ml})$	0.69	3.44	152.97
$C_{real}(\text{mg/ml})$	0.69	3.44	152.97

7. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων



Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρούμε πως στην περίπτωση και των δύο αναλυτών οι τιμές συγκέντρωσης Albumin για τους δύο υγιείς δότες είναι σχετικά κοντινές.

Αντίθετα, παρατηρείται πως η συγκέντρωση Albumin στα ούρα του ασθενή που πάσχει από νεφρική ανεπάρκεια είναι αρκετά απομακρυσμένη από τις αντίστοιχες φυσιολογικές.

Παράλληλα, παρατηρούμε πως υπάρχει διαφορά στις τιμές MFI του ίδιου δείγματος για κάθε analyte. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός πως είναι άλλο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει την ίδια πρωτεΐνη. Ο analyte 37 βγαζει υψηλότερες τιμες MFI ειδικά για στον ασθενή και στα wells που είχαμε βάλει σκέτη albumin.

Αν θα έπρεπε να επιλέξουμε έναν από τους δύο αναλυτές, όσον αφορά τον ασθενή δότη, θα επιλέγαμε τον analyte 37. Αυτό έγκειται στο γεγονός, πως στην περίπτωση του analyte 26, μία μικρή αλλαγή στο MFI του ασθενή θα οδηγούσε σε μία μεγάλη μεταβολή στη συγκέντρωση της Albumin, μη παρέχονται έτσι ακριβή αποτελέσματα.

Τέλος, όσον αφορά τον ασθενή, στον analyte 26, η τιμή MFI είναι εκτός των ορίων της καμπύλης με βάση τις αραιωμένες συγκεντρώσεις που μας δόθηκαν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Σημειώσεις Μαθήματος
- Wikipedia
- www.abnova.com
- www.ncbi.nlm.nih.gov
- www.thermofisher.com
- www.iatronet.gr
- www.wiki.com